

⑫ 公開特許公報(A) 平2-49718

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)2月20日

A 61 K 9/127

A

7417-4C

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全10頁)

⑮ 発明の名称 リボソーム製剤の精製法

⑯ 特 願 平1-50917

⑰ 出 願 平1(1989)3月1日

優先権主張 ⑱ 昭63(1988)3月4日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭63-52249

㉑ 昭63(1988)5月7日 ㉒ 日本(JP) ㉓ 特願 昭63-110792

⑳ 発 明 者 宇 田 良 明 兵庫県宝塚市仁川団地3番2-501号
 ㉑ 発 明 者 伊 賀 勝 美 大阪府吹田市五月が丘西1番A-808号
 ㉒ 発 明 者 星 野 哲 夫 大阪府豊中市寺内2丁目13番37-504号
 ㉓ 出 願 人 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目3番6号
 ㉔ 代 理 人 弁理士 岩 田 弘

明 細 書

1. 発明の名称

リボソーム製剤の精製法

2. 特許請求の範囲

(1) 薬物を封入してなるリボソームと未封入薬物とを含有してなる水性液をホローファイバーによる透析に付し、該ファイバーの外液中に未封入薬物を分離除去することを特徴とするリボソーム製剤の精製法。

(2) ホローファイバー中の水性液圧を外液圧よりも高くなるように制御する請求項(1)記載の方法。

(3) 差圧が300mmHg以下である請求項(2)記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は薬物を封入したリボソーム製剤の精製法に関する。

従来の技術

リン脂質と薬物液とから薬物を封入したリボソームを形成後は、一般に薬物封入リボソームと未封入の遊離薬物とを分離する工程が必要である。

その分離技術としては、従来、セロファン袋膜による透析法〔細胞工学、2,1136(1983)〕、超遠心分離法〔Biochemistry 17,1792(1978)〕、ゲルろ過法〔Biochemistry 8,344(1969)〕などが知られている。

上記のように、リボソームに未封入の遊離薬物を分離除去する方法は、従来、いくつか見られるものの、いずれの方法も工業的スケールで実施するには不適當である。例えば、セロファン袋膜を用いる方法は、処理対象液であるリボソーム懸濁液を袋膜に小分する作業が煩雑なこと、長時間の処理時間を要すること、品質が一定しないこと、無菌化製造することが容易でないことなどの欠点がある。超遠心分離法の場合、超遠心受器にリボソーム懸濁液を小分け分注し、遠心分離した後、上清を廃液して沈降物を回収するという操作を数回くり返して遊離薬物を除去する方法であり、やはり操作が煩雑となり、無菌化処理も困難なこと

が予想される。さらに、リボソームの種類(例えば、S U V, R E V)によっては、リボソームが完全に沈降せず、上清の廃液時に流出し、完全な回収が困難であることから、比較的粒径の大きいリボソームに限られること、また、遠心沈降によるリボソームの凝集が起こり、再分散後、凝集体を形成することが懸念される。

一方、ゲルろ過法は、薬物を吸着するための吸着剤を充填したカラムにリボソーム懸濁液を流通させ、未封入薬物を吸着分離する方法であるが、カラム流通速度が比較的遅いため、処理時間に長時間を要すること、カラム溶液液により希釈されるので、後に濃縮工程が必要であること、吸着剤にリン脂質が吸着することも起こりうるので、空リボソーム等での前処理が必要であること、ときには試料注入部位への物理的なブロッキングが認められること、また、再使用するには吸着剤の再生処理(吸着した薬物の再遊離除去処理)が必要であること、無菌化処理(使用前の吸着剤の滅菌処理)が困難であることなどの欠点がある。

本発明でいう「薬物を封入してなるリボソームと未封入薬物とを含有してなる水性液」は、水に薬物を封入してなるリボソームが懸濁しており、同時にその水に薬物が含有されている系であれば特に限定されない。一般にはリン脂質と薬物液を用いて自公知の方法によって薬物を封入するリボソームを調製した後に得られる液であって、該リボソームを懸濁し、かつ未封入の薬物を含有している水性液が主対象となる。以下、本明細書では上記の水性液を単に「リボソーム懸濁液」と称することもある。薬物を封入するリボソーム製剤の調製において、現在まで知られているリボソームの形成法では、未封入薬物の発生は避け難い。そして、リボソーム製剤をDDS (Drug Delivery System)等の目的で使用する場合、未封入薬物は予め除去しておくことが一般に望ましいことが多い。本発明の適用対象となりうるリボソームの種類は、S U V (small unilamellar vesicle), M L V (multilamellar vesicle), L U V (large unilamellar vesicle), R E V (reverse-phase

発明が解決しようとする課題

上記のように薬物封入リボソーム製剤の製造法において、未封入の遊離薬物を効率的に分離除去する方法はまだ完成されていない。この工業的実施のためには、大量処理が短時間で実施できること、無菌化処理が簡単にできること、リボソーム製剤の製造と連結することができ一貫した操作で、一日内に製品化できること、などの条件をできるだけ満足する必要がある。

課題を解決するための手段

以上の点に鑑み、本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、リボソーム製剤の製造における未封入薬物の分離除去にはホローファイバー型透析器が工業的に利用できることを知り、本発明を完成した。

すなわち、本発明は薬物を封入してなるリボソームと未封入薬物とを含有してなる水性液をホローファイバーによる透析に付し、該ファイバーの外液中に未封入薬物を分離除去することと特徴とするリボソーム製剤の精製法である。

evaporation vesicle)あるいはS P L V (stable plurilamellar vesicle)のいずれであってもよい。

次に、本発明に用いるホローファイバー型透析器は、半透膜の材質からなり中空を有する繊維を一般に数千本を束ねて形成し、かつ該繊維の外側に透析液を流通するように構成された装置をいう。この例としては、公知のホローファイバー型人工腎臓と同様に構成された透析装置があげられる。ホローファイバーの材質は、リボソーム形成材料であるリン脂質と反応もしくは吸着を起こさないことを基準に天然高分子膜またはその加工処理膜、再生高分子膜あるいは合成高分子膜のなかから選択すればよい。

具体的には、天然高分子膜またはその加工処理膜としてはセロファン、架橋コラーゲンが、再生高分子膜としては各種のセルロース系膜、たとえば、酢酸セルロース(例、酢化50%以上)、三酢酸セルロース、酢酸・酪酸セルロース、ニトロセルロース、キャプロ・アンモニウム・レーヨン膜等

があげられる。

また合成高分子膜としては、ポリビニールアルコール、ポリビニールピロリドン・メチレンビス・4・フェニルイソシアネート(MDI)、ポリエチレングリコールMDI、ポリビスフェノール・カーボネイト・ポリエチレンオキシド共重合体、ポリイオンコンプレックス、ポリプロピレン、ポリビニルアセテート、ポリスルホンカーボネイト、ポリエチレン、ポリアクリロニトリル、ポリメチルメタクリレート膜等が検討されており、これらの中でもポリビニールアルコールMDI、架橋コラーゲン、ポリビスフェノール・カーボネイト・ポリエチレンオキシド、ポリビニルアセテート、ポリスルホンカーボネイト、ポリアクリロニトリル、ポリメチルメタクリレート膜が本発明では好ましく用いられる。

ホローファイバー膜の透過性は尿素透析速度で表わしたときの半減期が、セロファンと同等もしくは小であることが一般に好ましく、たとえばセロファンの半減期を1とした場合、約0.2~1

の透過性を有するものが有利に使用できる。

本発明において、ホローファイバーの透過性を選択する基準は、使用する薬物の分子の大きさ等とも関係するのでこの点について説明する。

まず、ホリボソーム製剤の製造に用いられる薬物の種類は、水溶性薬物であってマイクロカプセル化して使用する可能性を有するものが対象となり得る。水溶性の程度は、たとえば、オクタノール/水で示される分配率の対数値が10以下であるものをいう。ホローファイバーは、薬物を透過しリボソームを透過しないような孔径を有するものを選択するが、薬物の透過性はファイバーの孔径と薬物の分子の大きさに関係する。例えば、孔径6Åではクレアチニン(分子量113)、15ÅでビタミンB₁₂(分子量1,350)、24Åでイヌリン(分子量5,200)、32ÅでチトクロームC(分子量24,000)、46Åでβ-イミノグロブリン(分子量38,000)、55Åでアルブミン(分子量60,000)等に相当し、透析性の目安になる。ホローファイバー型透析器の中空繊維膜とし

て一般によく使用されるキュプロ・アンモニウム・レーヨンの場合、孔径が約20Åである。分子量3,000以下の薬物であれば約20Åの孔径を有するホローファイバー膜で有効に透析される。

本発明においては、分子量が約100~約6万の薬物が好ましい適用対象である。以下に、本発明方法において適用可能な薬物の例を分子量の範囲別に示す。

(1) 分子量100以上1000以下

(例) シスプラチン(CDDP)、カルボプラチン、イブプロプラチン、テトラプラチン等の金属錯体、マイトマイシン、アドリアマイシン、アンサマイシン、アクチノマイシンあるいはその誘導体(例、9-エチオマイタシン)、プレオマイシン、Ara-C、ダウノマイシン等の抗癌抗生物質、5-FU、メトトレキサート、TAC-788〔イソブチル5-フルオロ-6-(E)-フルフリリデンアミノオキシ-1,2,3,4,5,6-ヘキサヒドロ-2,4-ジオキソピリミジン-5-カルボキシレート、特開昭59-13780号〕等の代謝拮抗剤、B

CNU、CCNU等のアルキル化剤；メルファラン、ミトキサントロン等の抗癌剤、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、カナマイシン、ジベカシン、バロモマイシン、カネドマイシン、リビドマイシン、トブラマイシン、アミカシン、フラジオマイシン、シソマイシン等のアミノ配糖系抗生物質、スルベニシリン、メシリナム、カルベニシリン、ビベラシリン、チカルシリン等のベニシリン類；チエナマイシン類；セフォチアム、セフスロジン、セフメノキシム、セフメタゾール、セファゾリン、セフォタキシム、セフォペラゾン、セフトキシム、モキシラクタム等のセファロsporin類等のβ-ラクタム系抗生物質、TRH類〔TRH、TRHアナログ(例、L-N-(2-オキソピペラジン-6-カルボニル)-L-ヒスチジル-L-チアゾリジン-4-カルボキサミド、L-2-オキソオキサゾリン-4-カルボニル-L-ヒスチジル-L-プロリンアミド、L-トランス-5-メチル-2-オキソオキサゾリン-4-カルボニル-L-ヒスチジル-L-プロリンアミド、L-2-オキ

ソチアゾリジン-4-カルボニル- γ -ヒスチジル- γ -プロリンアミド、 γ -ブチロラクトン- γ -カルボニル- γ -ヒスチジル- γ -プロリンアミド、2-ケトピペリジン-6-カルボニル- γ -ヒスチジル- γ -プロリンアミド、3-オキソバーヒドロ-1,4-チアジン-5-カルボニル- γ -ヒスチジル- γ -プロリンアミド)これらTRH、TRHアナログのアミド基における水素原子がメチル基、エチル基、 n -プロピル基、 n -ブチル基、 n -ヘキシル基、 n -アミル基、 β -フェネチル基で置換された化合物、ならびにこれら化合物の酢酸塩、酒石酸塩など]、エンケファリン等のペプチド系薬物、アスピリン、ジフルニサル、インドメタシン、ジクロフェナック、フェンブフェン、スハングク、アセメタシン、イブプロフェン、ナブキセン、ケトプロフェン、フラバイプロフェン、フェノプロフェン、チアプロフェン、プラノプロフェン、メフェナム酸、トルフェナム酸、フルフェナム酸、フェニルブタゾン、オキシフェン、ブタゾン、ピロキシカム、メビルゾーム、エモルファゾン等抗炎症剤、鎮痛剤、解熱剤として各種プロスタグランジン及びその誘導体。

症剤、鎮痛剤、解熱剤として各種プロスタグランジン及びその誘導体。

(2) 分子量1000以上2000以下

(例) グラミシジンD、バシトラシン等のペプチド系抗生物質

(3) 分子量2000以上5000以下

(例) ACTH、ポリミキシンB、コリスチン等ペプチド系物質

(4) 分子量5000以上10000以下

(例) ヘパリン、レンチナン、ザイモサン、PS-K等の多糖類、インスリン、成長ホルモン等のペプチドホルモン

(5) 分子量10000以上20000以下

(例) インターフェロン(α , β , γ)、インターロイキン2、TNF等のリンホカイン類

(6) 分子量20000以上60000以下

(例) SOD

次に、ホローファイバーは、通常、その中空内径が約150~250 μ m、膜厚さは約10~20 μ mの形状を有するものが好ましく用いられる。

ホローファイバー型の透析器として用いる場合、表面積の大きな一本のファイバーを使用してもよいが、大量処理の目的をより容易に達成するためには、小膜面積のホローファイバーを複数個並列または直列に連結して用いるのが有利である。さらに、ホローファイバーを多数集束して用いるのが好ましく、例えば、内径200 μ mで有効長23.5cmのホローファイバーを9900本集束させることによって、透析面積1.5 m^2 の透析器が得られ、この程度の表面積を有するものが実用的に利用しうる。集束させたホローファイバーをさらに直列または並列に連結させることにより、透析面積の拡大をはかってもよい。

次に、本発明の透析処理法においては、ホローファイバーの外側に液を流通させて、透過してきた薬物を系外に除去させるが、この透析外液として単に水を用いてもよいが、そのリボソーム製剤の投与形態に合うような液を用いるのが実用上、好都合である。すなわち、温血動物が生理的に許容しうるような各種物質の水溶液、具体的には、

塩類(例、食塩)、糖類(例、ぶどう糖、マンニト、ソルビット)、アミノ酸類(例、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸)などの水溶液あるいはこれらの2種またはそれ以上の混合溶液があげられる。これらの中でも、生理食塩水は各種薬剤の静脈投与の際に最も広く用いられている分散媒であり、本発明においても有利に用いることができる。

本発明方法は、たとえば第1図(a)(b)に示す装置を用いて、次のような順序で実施できる。

第1図(a)に示す装置において、貯留容器①にリボソーム懸濁液を仕込み、送液ポンプ②によって、送液パイプ③を介して連結されているホローファイバー型透析器④に液送される。該透析器④は第1図(b)に示される構造を有し、ホローファイバー⑤は接着固定部⑥によって集束された状態でケース⑦内に装着されており、該ケース⑦は透析外液流入口⑧および流出口⑨を有し、ホローファイバーの外側に透析外液を通過させる。リボソーム懸濁液は、透析器④の流入口③に液送され、ホローファイバー内に送り込まれ、流出

口⑤から、送液パイプ⑥を通して貯留容器①に戻る。一方、第1図(a)の貯留容器①に仕込まれた透析外液は送液ポンプ⑦によって送液パイプ⑥を通して、前記のホローファイバー型透析器の透析外液流入口⑧、流出口⑨、送液パイプ⑥を通して、透析器外に流出させる。この透析外液は、必要に応じて活性炭、イオン交換樹脂により薬物を吸着・除去したのち、循環使用し得る。かくして、リボソーム懸濁液中の遊離薬物はホローファイバーの膜を通過して、透析外液中に溶解して、次第に系外に分離されていき、精製されたリボソーム製剤を貯留容器①に回収することができる。

本発明において、ホローファイバー内液の圧力を透析外液のそれよりも高くなるように制御しながら透析を続けると、遊離薬物の除去効率を高めることができる。この差圧は一般に300mmHgまでに制御されるが、好ましくは約50mmHg以下さらに好ましくは10~50mmHgとなるように制御される。差圧を50mmHg以上にすると、水の透過も大きくなり、リボソーム分散液が濃縮

されてくるので、未封入の遊離薬物の分散除去と同時に濃縮を行なうことも可能である。ただ、過剰の差圧下で濃縮を行なわせると、リボソーム内に封入されている薬物が漏出してることがあり好ましくない場合がある。この差圧の制御方法は、たとえば第1図(a)に示される装置において、リボソーム懸濁液送液パイプ⑤および透析外液送液パイプ⑥にそれぞれ設置された差圧調整バルブ⑩によって調整される。特に、高分子量薬物(例、分子量1~6万)の場合には、拡散透析速度が遅いため、より効率を上げるためにホローファイバー膜内液を加圧して行なう中空纖維膜透析が有効であり、この場合、耐圧強度をもたせるために膜はやや厚い方がよい。

リボソーム懸濁液と透析外液は、第1図(a)のように、同流方式で流通させるのが一般的であるが、並流方式の場合によっては採用できる。ホローファイバー透析器は④に示すような装置を、さらに直列または並列で複数個連結させることにより、さらに大量処理に適した装置を用いてもよい。

一方、より実用的には第2図に示されるように、リボソーム製造装置と、たとえば第1図(b)に示されるホローファイバー透析装置とを直結させることによりクローズドシステムで、リボソーム懸濁液の製造と未封入薬物の分離除去を一貫処理でき、作業性を一段と向上させ得る。この場合、ホローファイバー透析装置は、予め高圧蒸気滅菌などの処理を施しておくことにより、精製されたリボソーム製剤を無菌的に製造することができる。

実施例

以下に実験例及び実施例を示し、本発明を更に詳しく説明するが、これらは何ら本発明を限定するものではない。

実験例1

(1) REVリボソームの製法

1ℓ底フラスコ中に、0.5mM 6-CF(6-カルボキシフルオレセイン)の生理食塩水溶液300mlとリン脂質(ジパルミトイルフォスファチジルコリン: ジステアシルフォスファチジルコリン=9:1)6gをクロロホルム: ジイソプロ

ピルエーテル(1:1)の混合溶媒300mlに溶解した液を入れて混合し、次に浴槽型超音波発生機(60W)で20分間超音波照射して乳化した。これを、55℃の水浴加温下で真空ロータリーエバポレーターによって有機溶媒を徐々に留去して、6-CFを封入するREVリボソームの懸濁液を調製した。本懸濁液にはリボソームに未封入の6-CFが溶解されている。

(2) 透析法

対照透析法: セロファン袋膜(内径2cm,長さ1m,0.08m²,スペクトラポア,SPECTRUM MEDICAL INDUSTRIES,INC.製)にリボソーム懸濁液300mlを充填し、これを生理食塩水溶液10ℓ中に浸漬し、室温下で攪拌しながら透析した。

本発明透析法: キュブラ・アンモニウム・レキオン使用のホローファイバー型透析器(中空の平均内径200μm,有効表面積0.8m²,TAF08W型,テルモ製)を用いて、リボソーム懸濁液循環流量150ml/分、透析外液(生理食塩水)の流量500ml/分で懸濁液と透析外液との差圧

が10 mmHgの条件でリボソーム懸濁液300 mlを処理した。

(3) 透析分離除去の効果の測定

未封入の遊離6-CFの分離除去の効果は、分離除去前のリボソーム懸濁液中の遊離6-CFの含量に対する分離除去後の同含量の百分率(残存率)で表わした。

(4) 遊離6-CFの測定法

リボソーム懸濁液の0.1 mlを採取し、セントリザルト(Centrisart 1, SM13249, 西独製)に入れ、生理食塩水1 mlを加えて遠心分離(2000 rpm, 5分間)して、遊離6-CFのみを含有する上清の一定量を蒸留水で100倍に希釈したのち、光路長1 cmの石英セルに入れ、蛍光分光器によって蛍光強度(励起波長494 nm、蛍光波長515 nm)を測定し、検量線から遊離6-CFを定量した。検量線は、別に6-CFの標準液の蛍光強度を測定し作成した。

(5) 結果

対照透析法と本発明透析法をそれぞれ適用した

処理時間を短縮することができた。

実験例2

実験例1と同様の方法で調製した6-CF封入リボソーム懸濁液を用いて、超遠心分離(12000×g, 30分間)法と本発明法とによる未封入6-CF液の分離効果について比較した。

その結果、超遠心分離法では、粒径の小さいリボソームが完全に沈降せずに上清中に浮遊し、傾斜分離操作中にリボソームが流出し、損失量が大であった。また、分離除去率は1回だけの超遠心分離処理では、6-CF残存率が6.3%と大きく、洗浄と遠心分離の操作を3回繰り返した後はじめて1%以下となり、従って約30分もの処理時間を要し、大量処理が困難であった。これに対し、本発明法は全ての種類のリボソームに適用でき、リボソームをほとんど損失することなく、きわめて短時間に大量処理できた。

実験例3

(1) シスプラチン(CDDP)封入のREVの調製

ときの、処理時間と6-CF残存率との関係を表1に示す。

表1

時間(hr)	6-CF残存率(%)									
	0	0.08	0.25	0.5	0.66	6	24	48	72	
対照透析法	100	-	-	-	-	78	27	6	<0.8	
本発明法	100	25	3	<1.0	<0.1	-	-	-	-	

表1の結果から明らかなように、セロファン袋膜透析法が、リボソーム中へ未封入の遊離6-CFの残存率が72時間(3日)後に漸く0.8%以下になるのに対し、本発明方法によると遊離6-CFの残存率は40分間で0.1%以下にすることができ、きわめて短時間で効率的に分離除去できる。

さらに、前記の本発明の透析法において、有効表面積を1.5 m²に増大したホローファイバーを使用した場合は、処理時間20分でも6-CF残存率を0.1%以下にすることができ、さらに処

実験例1のREV調製法において、6-CFの代わりにCDDP(300 mg)を用いて同様の方法によりCDDPを封入するリボソームを懸濁し、未封入のCDDPを溶解する液を得た。

(2) 透析法

対照透析法: 実験例1と同様に、セロファン袋膜にCDDP封入リボソーム懸濁液300 mlを充填し、同様の処理をした。

本発明透析法: 実験例1と同様の条件で、CDDP封入リボソーム懸濁液の300 mlを処理した。

(3) 透析分離除去の効果の測定

前記リボソーム懸濁液中の未封入の遊離CDDP含量を、実験例1の第(3)項に示したと同様の操作で、分離除去前及び分離除去後において定量し、残存率を測定した。

(4) 遊離CDDPの測定法

遊離CDDPの測定は実験例1の第(4)項に示したと同様の操作で、CDDP封入リボソームと遊離CDDPをセントリザルト(Centrisart 1,

SM13249、西独製)で分離し、遊離CDDPのみ含有する上清の0.1mlを採取し、内部標準液0.1mlを加えて、その一定量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法によって定量した。HPLCの条件を以下に示す。

カラム: 日立ゲル3013R 4mmφ×15cm

カラム温度: 50℃

分離液: 0.02M KH_2PO_4 -HCl(pH 3.0)

流速: 0.9ml/分、検出: UV210nm

内部標準液: ヒポキサンチン(4μg/ml)水溶液

表2にその結果を示す。

表2

時間(hr)	CDDP残存率(%)									
	0	0.08	0.25	0.33	0.5	6	24	48	72	
対照 透析法	100	-	-	-	-	78	27	8	<0.3	
本発明 法	100	21	4.0	1.2	<0.2	-	-	-	-	

この結果、セロファン袋膜透析法の場合、未封

入の遊離CDDPを分離除去できた。その結果、遊離のCDDPを含有せず、CDDPの封入率20%のリボソーム製剤を得た。

実施例2

実施例1と同様の方法で製造した、CDDP封入REVリボソーム懸濁液500mlを、ホローファイバー型透析器(有効表面積1.5m²、キューブラ・アンモニウム・レーヨン、テルモ製TAF-15W型)を用い、リボソーム懸濁液の循環流出側系路の差圧調整バルブを絞って圧力を高めて、透析外液側との差圧を70mmHgにした。この条件下で0.3時間処理し、未封入の遊離CDDPの残存率が0.5%以下で、リボソームを分散する液量が初期量の80%に濃縮されており、CDDPの封入率20%のリボソーム製剤を得た。

実施例3

前記実施例1と同様の方法で製造した、CDDP封入リボソーム懸濁液1000mlを調製した。この懸濁液をホローファイバー型透析器(有効表面積1.5m²、キューブラ・アンモニウム・レーヨ

ンの遊離CDDPの分離除去残存率が、72時間後(3日)後によく0.8%になるのに対し、本発明法によると30分後に0.2%にすることができ、きわめて短時間に分離除去できる。

実施例4

シスプラチン(CDDP)の1mg/ml生理食塩水溶液500mlとリン脂質(ジパルミトイルフォスファチジルコリン: ジステアシルフォスファチジルコリン=9:1)10gをクロロホルム: ジイソプロピルエーテル(1:1)の混合溶媒に溶解した溶液500mlとから、CDDP封入REVリボソームを実験例1の方法に準じて製造した。このリボソーム懸濁液をホローファイバー型透析器(有効表面積1.5m²、キューブラ・アンモニウム・レーヨン、テルモ製TAF-15W型)を用い、リボソーム懸濁液のホローファイバー内循環流量150ml/分、透析外液(生理食塩水)流量500ml/分、リボソーム懸濁液の循環液流出側系路と透析外液側との差圧を10mmHgに調整した。この条件下で0.5時間処理することにより、未封入

シ、テルモ製TAF-15W型)を2本並列に連結した透析器を用いて、リボソーム懸濁液側と透析外液側の差圧を10mmHgに調整した条件下で、未封入CDDPの分離除去を行い、処理時間0.5時間で遊離CDDPを実質的に含まず、CDDP封入率20%のリボソーム製剤を得た。

実施例4

CDDP 0.6gを溶解した生理食塩水溶液600mlとリン脂質(ジパルミトイルフォスファチジルコリン: ジステアシルフォスファチジルコリン=9:1)12gを溶解した有機溶媒溶液[クロロホルム: ジイソプロピルエーテル(1:1)]600mlとを真空乳化機(アジホモミキサーM型、特殊機工業製)に入れホモミキサー(回転数15000rpm, 30分間)で乳化し、60℃の加温及び減圧下でバドルミキサーによって撹拌(80回転/分)しながら、徐々に有機溶媒を留去してCDDPを封入するREVリボソームを製造した。このリボソーム懸濁液1150mlをホローファイバー型透析器(有効表面積1.5m²、キューブラ・ア

ンモニウム・レーヨン、テルモ製TAF-15W型)を用い、リボソーム懸濁液循環流量150 ml/分、透析外液に生理食塩水を用い流量500 ml/分で前者と後者の差圧を10 mmHgに調整した条件によって分離除去し、1.2時間でCDDP封入率20%のリボソーム製剤(1150 ml)を得た。

実施例5

実施例4と同様のホローファイバー型透析器(透析表面積1.5 m²、キューブラ・アンモニウム・レーヨン、テルモ製TAF-15W型)を予め高压蒸気滅菌した。この透析器にリボソーム製造装置である真空乳化機(アジホミキサーM型、特殊機化工業製)を直結し、実施例4と同様の方法でリボソーム製造後直ちにクロズドシステム(第2図)で、リボソーム懸濁液をホローファイバー内に循環させて透析外液に生理食塩水を用い、流量500 ml/分で、リボソーム分散液と透析外液との差圧を10 mmHgに調整した。この条件で未封入の遊離CDDPを分離除去し、無菌化リボソ-

ームを一貫処理で製造した。このとき、透析時間は1時間で、CDDP封入率20%のリボソーム分散液(1000 ml)を得た。

実施例6

卵黄レシチン1gを含有するクロロホルム溶液100 mlを500 ml用ナス型コルベンに入れ、真空ロータリーエバポレーターでクロロホルムを徐々に留去して、ガラス壁にリン脂質の薄膜を形成させ、これに生理食塩水に溶解した1 mg/mlのCDDP 60 mlを加え、よく攪拌しながらCDDPを封入し、CDDP液に分散されたMLVを製造した。この方法でMLVを5パッチ製造し、これらを合わせ得た300 mlをホローファイバー型透析器(キューブラ・アンモニウム・レーヨン、有効表面積0.8 m²、TAF08型、テルモ製)を用い、リボソーム循環流量150 ml/分、透析外液流量(生理食塩水)500 ml/分で処理し、未封入の遊離CDDPを分離除去して、0.3時間で封入率3%のリボソーム分散液(300 ml)を得た。

実施例7

件で未封入の遊離Ara-Cを分離除去して、0.5時間処理で封入率20%のリボソーム分散液(300 ml)を得た。

実施例10

実施例1で用いられる1 mg/ml CDDPの代わりに、200 μg/mlのビスクロルエチルニトロソウレア(BCNU)を用いて、それ以外は実施例1と同じ方法で、BCNUを封入するリボソーム製剤を得て、同じ透析条件で未封入の遊離BCNUを分離除去して、0.5時間処理で封入率20%のリボソーム分散液(300 ml)を得た。

実施例11

18gのDPPCと2gのDSPCを2ℓのビーカー内でクロロホルムとイソプロピルエーテルの1:1の混合溶液1000 mlに溶解した。この溶液に浸透圧が生理食塩水の浸透圧の1.9倍となるようにあらかじめ調整しておいた500 μg/mlのCDDP食塩水溶液を1000 ml加え軽く混合した後、乳化機(3ℓ用ホモミキサー、特殊機化工業製)で60分間乳化しW/Oエマルジョンを

実施例1で用いられる1 mg/ml CDDPの代わりに200 μg/mlの5-フルオロウラシル(5-FU)を用いて、それ以外は実施例1と同じ方法で、5-FUを封入するリボソーム懸濁液を得て、同じ透析条件で未封入の遊離5-FUを分離除去して、0.5時間処理で封入率22%のリボソーム分散液(300 ml)を得た。

実施例8

実施例1で用いられる1 mg/ml CDDPの代わりに、200 μg/mlのマイトマイシンC(MMC)を用いて、それ以外は実施例1と同じ方法で、MMCを封入するリボソーム製剤を得て、同じ透析条件で未封入の遊離MMCを分離除去して、0.5時間処理で封入率24%のリボソーム分散液(300 ml)を得た。

実施例9

実施例1で用いられる1 mg/ml CDDPの代わりに、500 μg/mlのアクラルピシン(Ara-C)を用いて、それ以外は実施例1と同じ方法で、Ara-Cを封入するリボソーム製剤を得て、同じ透析条

作製した。このようにして得たエマルジョンを同じホモミキサーを用いて、60℃減圧下で有機溶媒を留去することによりUVを得た。さらに得られたUVの一部500mlをホローファイバー型透析器[AM-Neo-2001型、旭化成製、ファイバー長約25cm、有効膜面積1.5m²]中に、約150ml/分の速度で注入し、透析外液として生理食塩水をホローファイバーにかかる膜圧が0となるように、約500ml/分の速度で流すことにより、遊離のCDDPを透析除去し、CDDPが上記高張溶液と共に封入されたリボソーム製剤を得た。

発明の効果

本発明によると、薬物を封入してなるリボソームと未封入薬物とを含有してなる水性液から、未封入薬物を実用的に有利に分離除去でき、リボソーム製剤の精製法として極めて有用である。すなわち、従来、採用されてきた透析袋膜法、遠心分離法、ゲルろ過法に比較して、短時間に大量処理が可能であること、透析装置の殺菌処理が可能で

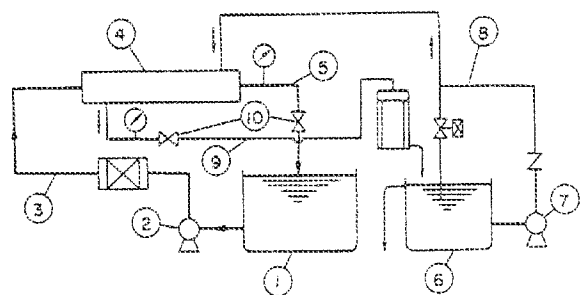
ありかつリボソーム製造装置と直結したクローズドシステムを採用しうること、などにおいて極めて実用に適した方法である。また、本発明方法を適用しても、リボソームに損傷を与えることがなく、封入された薬物の漏出を起こさないで、この点でも優れた方法である。

4. 図面の簡単な説明

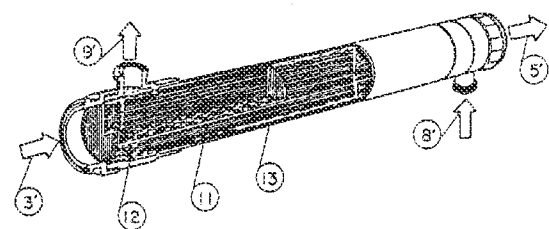
第1図(a)は、本発明に用いる装置の1例を示す。図中、①はリボソーム懸濁液貯留容器、②はリボソーム懸濁液送液ポンプ、③および⑤はリボソーム懸濁液の送液パイプ、④はホローファイバー型透析器、⑥は透析外液貯留容器、⑦は透析外液送液ポンプ、⑧および⑨は透析外液送液パイプ、⑩は差圧調整バルブをそれぞれ示す。

第1図(b)は、第1図(a)中の④ホローファイバー型透析器の拡大図を示す。⑪中空繊維膜(ホローファイバー)、⑫中空繊維束束接着固定部、⑬ケース、⑭リボソーム懸濁液流入口(透析前)、⑮リボソーム懸濁液流出口(透析後)、⑯透析外液流入口、⑰透析外液流出口をそれぞれ示す。

第1図(a)



第1図(b)



第2図は、リボソーム製造装置にホローファイバー型透析器を直結させ、薬物を封入するリボソームの調製と未封入の薬物の分離を無菌的に一貫して実施できる装置の一例を示す。図中、①リボソーム製造装置(真空乳化機)、②リボソーム懸濁液、③ホローファイバー型透析器、④リボソーム懸濁液循環送液ポンプ、⑤透析外液送液ポンプ、⑥リボソーム懸濁液送液パイプ、⑦透析外液送液パイプ、⑧中空繊維内側圧調整バルブ、⑨透析外液側圧調整バルブ、⑩透析外液貯留タンクをそれぞれ示す。

代理人 弁理士 岩田 弘

第 2 図

